

# CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO MORFO-BIOLÓGICO DO *PENICILLIUM NOTATUM*

HASSIB ASHCAR

Assistente do Diretor do Instituto Adolfo Lutz

## I. INTRODUÇÃO.

## II. ESTUDO MICOLÓGICO:

- 1) Posição sistemática.
- 2) Condições de cultivo.
- 3) Macroscopia das culturas: a) em meios sólidos; b) em meios líquidos; c) cultura seca.
- 4) Microscopia das culturas.
- 5) Caracteres bioquímicos: a) provas de fermentação; b) outras provas.
- 6) Patogenicidade (inoculações): a) em coelhos; b) em cobaias; c) em camundongos.

## III. ENSÁIOS SOBRE PENICILINA:

- 1) Produção de penicilina.
- 2) Determinação do poder bacteriostático.
- 3) Resultados obtidos.

## IV. CONCLUSÕES — REFERÊNCIAS.

### I. INTRODUÇÃO

Encetamos um estudo sobre a morfo-biologia do *Penicillium notatum*, em virtude da faculdade que possui esse cogumelo de produzir uma substância não tóxica e altamente bacteriostática sobre numerosas bactérias patogênicas, inclusive o *Streptococcus viridans*.

Embora as sulfamidas dominem atualmente no campo da quimioterapia, vários autores têm pesquisado e estudado substâncias produzidas por bactérias e cogumelos que possuem propriedades bacteriostáticas, bacteriolíticas e bactericidas, sobre microorganismos patogênicos.

Essas propriedades representam antagonismos microbianos cujo estudo tomou impulso com os trabalhos de Metchnikoff. Em 1929, Fleming observou que um cogumelo do gênero *Penicillium* era capaz de produzir em cultivo uma substância filtravel com acentuada propriedade bacteriostática sobre várias bactérias Gram-positivas (estafilococos, estreptococos, etc.) e algumas Gram-negativas (gonococos e meningococos). Essa substância, à qual denominou penicilina, não inibia o *H. influenzae*, o bacilo coli e outros. Sugeriu que a penicilina poderia ser usada como agente inibidor no isolamento de certos germes, particularmente do *H. influenzae*, e, como agente antisséptico, no tratamento local de feridas infectadas. Em 1932, Clutterbuck, Lovell e Raistrick modificaram o meio líquido de Czapek-Dox e nele cultivaram o *Penicillium notatum*; verificaram a produção de penicilina porém apenas isolaram um pigmento — crisogenina, que não apresentava ação antibacteriana. Em 1935, Reid embora não tenha conseguido isolar a penicilina, estudou algumas de suas propriedades e confirmou as observações de Fleming.

Em 1940, Chain e colaboradores elaboraram métodos destinados a obter uma quantidade consideravel de penicilina e a determinar seu poder inibidor, antibacteriano. Conseguiram obter das culturas um pó pardo cuja solução aquosa era estável por muito tempo e, embora não fosse uma substância pura, possuía um poder antibacteriano bem acentuado.

Em 1941, Abraham, Chain e outros, em trabalho minucioso, descreveram um método de produção, extração e purificação de penicilina em larga escala; demonstraram seu alto poder inibidor sobre numerosas bactérias patogênicas e verificaram que o seu poder bacteriostático sobre os estafilococos e estreptococos é muito maior que o das sulfamidas. Demonstraram também que essa substância desenvolve uma ação terapêutica consideravel em infecções experimentais em animais e em infecções piógenas no homem.

Recentemente, Chain, numa sessão da Sociedade de Bioquímica de Oxford, descrevendo as propriedades químicas e físicas da penicilina, refere que é um ácido forte com 2 grupos ácidos ou múltiplos de dois e que na molécula existe carbono, hidrogênio e oxigênio. Na sua estrutura molecular, não encontrou o grupo metoxil, verificando, entretanto, 2 grupos hidroxil. Afirma ainda que o sal seco de bário, obtido da P se mantém indefinidamente e, na solução aquosa, é mais estável entre pH 5 e 7.

Na mesma sessão, Abraham relata que a instabilidade da *P* obriga a recorrer a 3 métodos de purificação, dependendo da dissolução nos solventes, adsorção seletiva e redução. Dessa forma, o sal branco de bário obtido apresentou uma atividade de 240 unidades por miligrama e inibiu completamente o estafilococo em uma diluição de 1/16.000.000.

Fleming, ainda na mesma ocasião, prevê que a penicilina desde que tenha, pelo que parece, uma constituição diferente da das sulfamidas, o isolamento e a síntese da substância ativa sob forma pura, abrirá um novo campo na quimioterapia.

## II. ESTUDO MICOLÓGICO

1. *Posição sistemática:* O microorganismo que vamos estudar pertence ao ramo Eumycetes, classe Ascomycetes, ordem Plectascales, família Aspergillaceae, gênero *Penicillium*, espécie *P. notatum*.

*Procedência:* A cultura que ainda continua em estudos foi enviada ao Instituto Adolfo Lutz, pelo Dr. Charles Thom, do "United States Department of Agriculture", com a indicação 144-5767 do germe de Fleming.

### 2. *Condições de cultivo:*

O *Penicillium notatum* é um cogumelo aeróbio, não se desenvolvendo em anaerobiose. Cresce bem em temperatura ambiente (18-26°C). Em geladeira (+ 4°C.), o seu desenvolvimento é muito lento, o mesmo acontecendo em estufa a 37°C. Em seus ensaios, Abraham e colaboradores cultivaram-no com sucesso a 24°C. É pouco sensível às mudanças de pH. Desenvolve-se bem nos meios comuns de cultura: meios de Sabouraud, Czapek-Dox, etc.. O extrato de levedura (desde 0,1%) acelera o crescimento do cogumelo, ao passo que o nitrito de sódio (0,3%) o retarda acentuadamente.

### 3. *Macroscopia das culturas:*

a) *Em meios sólidos — Caracteres das colônias gigantes:* Semeamos uma suspensão de esporos em frascos de Erhlenmeyer com meio de Sabouraud glicose e verificamos após 5-7 dias de incubação, em temperatura ambiente (18-26°C.), o seguinte aspecto: Desenvolvimento de uma colônia discóide com alguns cen-

timetros de diâmetro. A face superior da colônia é seca, de aspecto rugoso e de natureza aveludada. Apresenta numerosos sulcos dispostos como raios de circunferência. Quanto à cor e ao aspecto, distinguimos 3 zonas concêntricas: central, intermediária e periférica. A zona central de cor verde é mais saliente, possui filamentos mais aéreos e apresenta, na superfície, gotas amareias que não molham a colônia. A zona intermediária de cor branca com nuances esverdeadas, possui filamentos menos aéreos que se continuam externamente por delicadíssimos filamentos como franjas de 2 a 3 milímetros de extensão, aderentes ao meio e que constituem a zona periférica. As gotas que frequentemente aparecem na superfície da colônia formam-se à expensas da água do meio de cultura.

A face inferior da colônia é úmida, lisa, de cor branco-amarelada e apresenta-se crivada ou fendida, principalmente, quando existem gotas na face superior ou aeróbia. A colônia elabora um pigmento amarelo que se difunde no meio de cultura. No meio de Sabouraud maltose os caracteres das colônias são semelhantes aos já descritos, apenas com variação na tonalidade das cores. A fotografia nº 1, mostra um aspecto da colônia gigante do *P.notatum* nesse meio de cultura.

No meio de Czapek-Dox modificado com 2% de agar os caracteres das colônias se repetem, porém o pigmento amarelo aparece melhor e se difunde facilmente pelo meio terminando por corá-lo completamente de amarelo.

b) *Em meios líquidos:* No meio de Czapek-Dox, modificado por Clutterbuck, Lovell e Raistrick, observamos todos os caracteres já descritos por Abraham e colaboradores. Em caldo Hottinger o cogumelo desenvolve-se mais lentamente, podendo-se entretanto, acelerar o crescimento juntando-se a esse meio 4% de glicose. Nesses meios líquidos com mais de 2 centímetros de altura, além do crescimento na superfície com aspecto de feltro contínuo e compacto, o cogumelo forma no fundo do frasco um sedimento branco, de aspecto floconoso. O pigmento amarelo acima referido é elaborado pelo micélio superficial e rapidamente se difunde no meio tornando-o, de incolor, amarelo ouro. Algumas vezes a produção de pigmento é pequena e o meio fica levemente corado (amarelo pálido); outras vezes, a cor do meio torna-se amarelo-alaranjada, e até avermelhada, quando a produção do pigmento é muito intensa.

c) *Cultura seca*: Semeamos o cogumelo no meio de Czapek-Dox com 5% de extrato de levedura e, após vários meses de exposição à temperatura ambiente, obtivemos a cultura seca. Esta apresentava-se com o aspecto de pó escuro, côr de cacau. Examinado ao microscópio verificamos que esse pó era formado principalmente por esporos de morfologia normal e fragmentos de micélio ou hifas.

A cultura seca repicada, após 10 meses, nos meios habituais de cultura, reproduziu o cogumelo com todos os seus caracteres morfológicos e bioquímicos. Conservou assim, as propriedades de fermentar a dextrose, sacarose, maltose, e glicerina como também as de elaborar pigmento e de produzir penicilina.

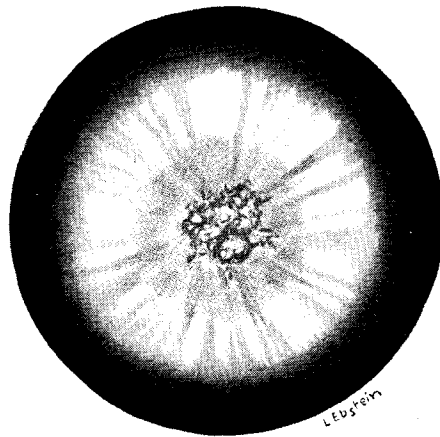
Temos a impressão de que é possível obter com êxito culturas secas de outros cogumelos o que evitaria repiques frequentes, diminuiria as possibilidades de contaminação e de perda das culturas.

#### 4. *Microscopia das culturas*:

As culturas de 2 a 3 dias em temperatura ambiente, apresentam um micélio desenvolvido constituído por filamentos septados ou hifas retilíneas ou enroladas, muitas vezes se anastomosando e emitindo ramificações laterais. O micélio dá também origem a filamentos férteis denominados conidióforos que sustentam os aparelhos reprodutores do cogumelo. O aparelho reprodutor, chamado conidiano e que caracteriza o gênero *Penicillium* tem a forma de pincel ou vassoura. Ele é formado por um conifióforo, filamento fértil, que se divide em ramos; esses por sua vez se dividem dando râmulos ou, diretamente, dão origem às metulas que sustentam células alongadas esporógenas denominadas fiálides ou esterigmatas. Essas últimas geram esporos assexuados chamados conídios que se dispõem em cadeias no seu próprio prolongamento. As fiálides, em número de duas, três ou mais, formam entre si ângulos agudos cujos vértices estão ligados às extremidades distais das metulas constituindo assim os verticílios.

Observando-se o cogumelo após 5-7 dias de cultivo, verifica-se que aumenta muito o número de aparelhos conidianos, os quais então libertam grande quantidade de exosporos. A fotografia nº 2 mostra um aspécto do cogumelo nesta fase.





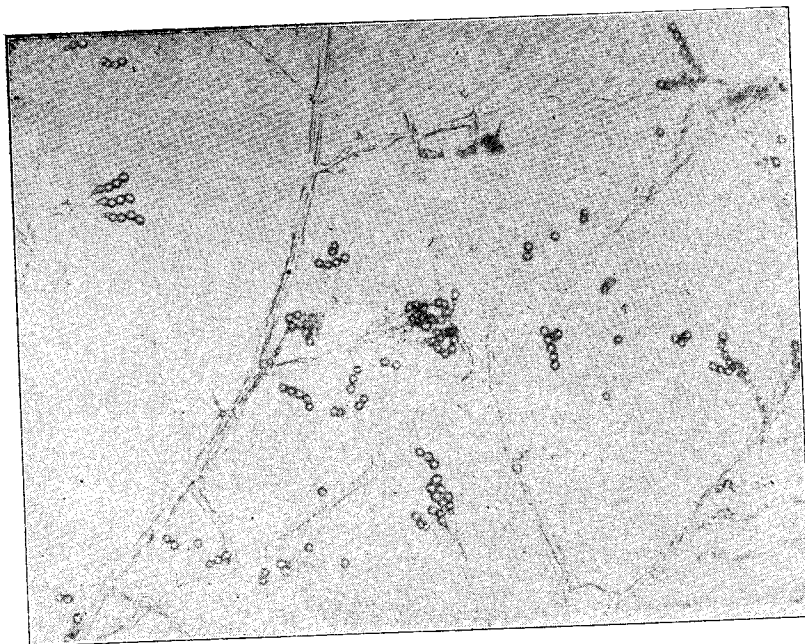
FOTOGRAFIA n. 1

Colônia gigante do *P. notatum*, 7 dias de cultivo em meio de Sabouraud maltose.





Os exosporos são geralmente redondos, hialinos; assemelham-se a hemátias humanas, porém, são menores, medindo de 3,0 a 5,2 micras de diâmetro. A maior parte, entretanto, (cerca de 85%), possui diâmetros que variam de 4 a 5 micras.



FOTOGRAFIA n. 2

Microfotografia do *Penicillium notatum* em meio de Czapek-Dox modificado. 7 dias de cultivo em temperatura ambiente. Aumento: 200 diâmetros.

Segundo a fase evolutiva pode-se encontrar esporos pedunculados em início de germinação. Os pedúnculos são expansões citoplasmáticas acidófilas que se coram em vermelho pelo método de Gram, ao passo que os esporos, que são basófilos, se coram em violeta.

##### 5. Caracteres Bioquímicos:

a) *Provas de fermentação*: Utilizamos o meio semi-sólido de Hiss com fenol vermelho como indicador. Incubação em estufas a 18°C. e 28°C.

As leituras feitas após 48 horas de incubação revelaram que o *P. notatum* fermenta a dextrose, sacarose, maltose e glicerina, porém sem produção de gás. Após 5 dias, os resultados se repetiram com acidificação menos intensa com exceção dos tubos de glicerina

que indicaram acidificação maior. Nos dias seguintes observamos mudança do indicador para o lado alcalino nos tubos de dextrose, sacarose e maltose, enquanto que nos tubos de glicerina permaneceu a acidificação por tempo mais longo (3-4 semanas).

Foram negativas as provas de fermentação de: adonita, amido, arabinose, dextrina, dulcita, esculina, galactose, inulina, inosita, lactose, levulose, manita, rafinose, salicina, sorbita, trealose e xilose.

b) *Outras provás:* O cogumelo não acidifica nem coagula o leite, porém cresce bem nesse meio produzindo pigmento amarelo. Não liquefaz a gelatina. Reações de Voges-Proskauer e de vermelho de metila negativas (5 dias).

Não produz indol e não reduz nitratos a nitritos (10 dias).

#### 6. *Patogenicidade:*

Não encontramos referências na literatura consultada sobre a patogenicidade ou inocuidade do *Penicillium notatum*. Para nos certificarmos si a sua manipulação poderia ou não oferecer perigo de infecção, fizemos inoculações em animais de laboratório. Preparamos uma suspensão de esporos lavando, com 10 cc. de solução fisiológica, a superfície de uma cultura de 7 dias em meio sólido inclinado.

a) *Inoculações em coelhos:* Injetamos 1 cc. da suspensão de esporos na veia de um coelho. Noutro coelho injetamos a mesma dose por via subcutânea. 10 dias após reinoculamos com as mesmas doses. Não verificamos reações térmicas nem outros sintomas de moléstia durante 3 meses de observação.

b) *Inoculações em cobaias:* Em 4 cobaias, cujos pesos variavam de 225 a 330 grs., injetamos 0,5 cc. de suspensão de esporos, subcutaneamente, na virilha. Inoculamos também a mesma dose numa 5.<sup>a</sup> cobaia, porém, intraperitonealmente. Uma das 4 primeiras morreu acidentalmente 24 horas após. A autópsia nada revelou, a não ser leve hiperemia no ponto de inoculação. 10 dias após, as cobaias restantes foram reinoculadas com as mesmas doses. Uma semana depois da 2.<sup>a</sup> inoculação, morreu a cobaia injetada intraperitonealmente. A autópsia nada revelou. O exame histopatológico do pulmão revelou apenas hiperemia e infiltração peri-vascular. O exame do fígado demonstrou apenas discreta infiltração peri-vascular. As culturas desses órgãos foram negativas para o cogumelo em estudo. Após 3 meses de observação, as 3 cobaias restantes continuavam normais. Sacrificamos uma delas e semea-

mos fragmentos de fígado, pulmão e baço em meio de Sabouraud glicose, resultando culturas negativas.

c) *Inoculações em camundongos*: Inoculamos 0,2 cc. de suspensão de esporos em 10 camundongos de 20 a 25 grs., sendo em 5 por via intraperitoneal e, nos 5 restantes, por via subcutânea. 10 dias depois foram reinoculados com as mesmas doses. Todos sobreviveram e não apresentaram quaisquer sintomas de moléstia, durante 3 meses de observação. Após esse tempo, sacrificamos 2 camundongos e retiramos fragmentos de fígado, pulmão e baço que foram semeados em meio de Sabouraud glicose, com resultados negativos.

### III. ENSAIOS SOBRE PENICILINA

#### 1. *Produção de penicilina*:

Afim de obtermos penicilina e analisarmos suas propriedades, semeamos esporos do cogumelo em frascos de Fernbach contendo meios líquidos de cultura cujas alturas não excediam de 2 centímetros. O meio que mais usamos e que forneceu material para a maior parte de nossas pesquisas foi o de Czapek-Dox modificado, cuja fórmula é a seguinte:

NaNO <sub>3</sub> .....	3,0 grs.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,0 grs.
KCl .....	0,5 grs.
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,5 grs.
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,01 grs.
Glicose anidra .....	40,0 grs.
Água destilada .....	1000 cc.

A incubação foi feita em temperatura ambiente (18-26°C.).

Em alguns frascos adicionamos ao meio 0,01% e noutros 0,02% de sulfato de zinco; entretanto, não verificamos nem aceleração no crescimento, nem aumento na produção de penicilina. A glicose favorece o crescimento do cogumelo e a pigmentação do micélio, porém não é indispensável para a produção de penicilina. A fermentação da glicose parece ser a causa da acidificação do meio de cultura nos primeiros dias de cultivo. O pH do meio, inicialmente em torno de 6,0, pode baixar muito, chegando a 2,0 entre o 4º e 5º dias; depois torna a se elevar até ficar francamente alcalino. Em torno da neutralidade se obtêm o maior teor em penicilina; este ponto foi por nós verificado, após 9 a 10 dias, no

primeiro cultivo em temperatura ambiente. Retirando-se o líquido de cultivo com penicilina e substituindo-o por outro esteril, o cogumelo, no mesmo frasco, produzirá o máximo de penicilina num tempo menor (5 a 7 dias), uma vez que já se encontra bem desenvolvido.

Em caldo Hottinger, com glicose ou sem, verificamos também a produção de penicilina, porém, em quantidade menor.

### 2. Determinação do poder bacteriostático:

Na avaliação do poder bacteriostático da penicilina, empregamos 2 métodos:

1º) Em tubos de caldo simples ou de caldo soro.

2º) Em placas de agar comum ou de outros meios sólidos.

No primeiro método, faz-se, em caldo, uma série de diluições de penicilina cuja atividade será representada pelo título da maior diluição que inibir completamente o crescimento de um germe dado.

No segundo método, a atividade pode ser avaliada quer pela área de inibição, quer medindo em milímetros o diâmetro da mesma quando for circular. Fazendo provas com *Staphylococcus aureus* e empregando o método em placas, Abraham e colaboradores consideraram como unidade (arbitrária) de penicilina a quantidade de P que, dissolvida em 1 cc. de água, produz uma área de inibição com 24 milímetros de diâmetro médio.

No método em tubos a técnica que adotamos foi a seguinte:

Em tubos com 5 cc. de caldo simples, fizemos diluições seriadas das preparações de penicilina, a partir da diluição de 1 para 5. A cada tubo de diluição semeamos 1 alça (2 mm. de diâmetro) de uma suspensão homogênea de bactérias resultantes da diluição, a 1 por 20, de uma cultura em caldo de *Staphylococcus aureus*, incubada a 37.C. durante 18 a 24 horas.

### 3. Resultados obtidos:

O filtrado de cultura em meio de Czapek-Dox modificado, revelou inibição total das diluições a 1/10 e 1/20 e inibição parcial na diluição a 1/40.

O filtrado de cultura em caldo Hottinger com 4% de glicose: inibição total na diluição a 1/10; inibição parcial nas diluições a 1/20 e 1/40. O mesmo filtrado em caldo Hottinger sem glicose:

inibição total na diluição a 1/5; inibição parcial na diluição a 1/10 e 1/20.

No método em placas, adotamos a técnica seguida por Abraham e colaboradores. Utilizando penicilina concentrada, fizemos provas de bacteriostase com numerosas raças de estafilococos e com várias de estreptococos, pneumococos, gonococos e algumas do grupo coli-tífico. A fotografia n° 3 mostra a área circular de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* pela penicilina.



FOTOGRAFIA n. 3

Cultura de *Staphylococcus aureus* com área circular de inibição pela penicilina.

As provas com estafilococos e com os germes do grupo coli-tífico, foram feitas em placas de agar comum, e, os resultados foram observados 24 horas após incubação em estufa a 37°C. Usamos, para as provas com estreptococos e pneumococos, placas de agar-sangue, e, para as com gonococos, placas de agar-ascite. A leitura dessas provas foi feita 48 horas após incubação a 37°C. Os resultados obtidos estão resumidos no quadro I.

QUADRO I

N. das culturas	Bactérias examinadas	Diâmetro médio em milímetros de inibição total do crescimento pela penicilina	Proveniência
<i>Staphylococcus:</i>			
4	S. aureus	22,0	Sicose
5	S. aureus	21,0	Laboratório
9	S. aureus	19,5	Garganta
12	S. aureus	19,0	Liquor
13	S. aureus	20,0	Peritonite
16	S. aureus	19,0	Furúnculo
21	S. aureus	25,0	Pus
23	S. aureus	21,0	Sangue
24	S. aureus	23,0	Bile C.
25	S. aureus	25,0	Pênfigo
26	S. aureus	22,5	Furúnculo
5	S. albus	19,5	Furúnculo
6	S. albus	20,0	Urina
7	S. albus	18,0	Garganta
8	S. albus	21,0	Nariz
10	S. albus	31,0	Pus
12	S. albus	27,0	Gânglio
13	S. albus	30,0	Bile C.
9	S. citreus	21,0	Úlcera gástrica
16	S. pyogenes	25,0	Hemocultura
1.108	S. pyogenes	19,0	Hemocultura
1.114	S. pyogenes	23,0	Hemocultura
1.116	S. pyogenes	22,5	Hemocultura
4.108	S. pyogenes	24,0	Coleção
4.114	S. pyogenes	23,0	Hemocultura
4.115	S. viridans	17,0	Hemocultura
4.116	S. viridans	15,0	Hemocultura
4.117	S. viridans	15,0	Dente
<i>Diplococcus:</i>			
1	D. pneumoniae (tipo I)	24,0	Departamento de Saúde de Nova York
2	D. pneumoniae (tipo II)	22,5	
3	D. pneumoniae (tipo III)	23,0	

QUADRO I (cont.)

N. das culturas	Bactérias examinadas	Diâmetro médio em milímetros de inibição total do crescimento pela penicilina	Proveniência
3	<i>Neisseria:</i> N. gonorrhoeae	22,5	Uretrite
4	N. gonorrhoeae	22,0	Uretrite
	<i>Escherichia:</i>		
7	E. coli	0	Fezes
9	E. coli	0	Hemocultura
	<i>Eberthella:</i>		
1.242	E. typhosa	0	Hemocultura
1.276	E. typhosa	0	Hemocultura

## IV. CONCLUSÕES

1. O extrato de levedura desde a concentração de 0,1% acelera o crescimento do *Penicillium notatum*.
2. Substituindo-se, no meio Czapek-Dox modificado, o nitrato de sódio por igual percentagem de nitrito de sódio, verifica-se um retardamento acentuado no desenvolvimento desse cogumelo.
3. A dextrose favorece o crescimento do cogumelo assim como a pigmentação do micélio.
4. O *P. notatum* fermenta a dextrose, sacarose, maltose e glicerina, sem produção de gás. Não fermenta adonita, amido, arabinose, dextrina, dulcita, esculina, galactose, inulina, inosita, lactose, levulose, manita, rafinose, salicina, trealose e xilose. Não acidifica nem coagula o leite. Não liquefaz a gelatina; não produz indol e não reduz nitratos a nitritos.
5. Desse germe pode-se obter culturas secas que conservam, integralmente, por longo tempo (10 meses de observação), os caracteres morfológicos, as propriedades bioquímicas, inclusive, a faculdade de produzir penicilina.
6. Os esporos de *P. notatum* não são patogênicos para coelhos, cobaias e camundongos.
7. O meio de Czapek-Dox modificado por Clutterbuck, Lovell e Raistrick, mostrou-se superior ao caldo Hottinger para a produção de penicilina.

8. O catião zinco, que estimula o *Aspergillus niger* na produção do ácido cítrico, não exerce influência sobre a elaboração da penicilina, a qual por Chain é considerada ácido orgânico.

9. O método em placas, para determinação do poder bacteriostático da penicilina, não é tão preciso como o das diluições seriadas em tubos, porém foi o que mais usamos por ser mais rápido e econômico e porque, nessas primeiras provas, visamos mais o aspecto qualitativo do que o quantitativo.

10. Os estafilococos (*aureus*, *albus* e *citreus*), os estreptococos (grupo *pyogenes*), os pneumococos e os gonococos sofreram nítida e semelhante inibição no crescimento pela penicilina.

11. Os estreptococos do grupo *viridans* foram também inibidos, porém, revelaram uma sensibilidade menor.

12. As 2 raças de *Escherichia coli*, e as 2 de *Eberthella typhosa* examinadas, mostraram-se insensíveis à ação bacteriostática da penicilina.

#### SUMMARY

1) The yeast-extract of at least 0,1% concentration speeds up the growth of the *Penicillium notatum*.

2) By changing, in the modified Czapek-Dox' medium, sodium nitrate by an equal quantity of sodium nitrite, one observes a very remarkable delay in the growth of this mould.

3) The dextrose helps the growth of the mould as well as the pigmentation of the mycelium.

4) The *P. notatum* ferments dextrose, sucrose, maltose, and glycerol, without production of gas. It has no action on: adonitol, starch, arabinose, dextrin, dulcitol, esculin, galactose, inulin, inositol, lactose, levulose, mannitol, raffinose, salicin, trehalose and xylose. The milk is not acidified or coagulated by it. Gelatin is not liquefied; indol is not formed and nitrites are not produced from nitrates by it.

5) From this organism we could get dry cultures that maintain, for a long time, (10 months of observation), entirely morphologic characters, biochemical activities, including the ability to produce penicillin.

6) The spores of *P. notatum* are not pathogenic for rabbits, guinea-pigs or mice.

7) The Czapek-Dox' medium modified by Clutterburck, Lovell and Raistrick has shown itself to be superior to Hottinger's broth in the production of penicillin.



8) The zinc cation that helps the *Aspergillus niger* in the production of citric acid, is inactive in the production of penicillin that is recognized by Chain as an organic acid.

9) The plate method for determinating the bacteriostatic power of penicillin, is not so exact as the method of tubes with dilutions in series, but it has been used by us because it is quicker and more economic and because, in these first researches, we aimed more at qualitative than at the quantitative aspect.

10) The growth of *Staphylococcus (aureus, albus and citreus)*, *Streptococcus (pyogenes group)*, *Pneumococcus* and *Gonococcus* was distinctly and always, in a similar manner, inhibited by the penicillin.

11) The growth of *Streptococcus* of the *viridans group* was also inhibited but they showed less sensitiveness.

12) The two strains of *Escherichia coli* and those of *Eberthella typhosa* that were researched by us showed themselves as without sensitiveness to the bacteriostatic action of penicillin.

#### REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E. P. — 1941 — Lancet, 2 (25), 762.  
ABRAHAM, E. P. e outros — 1941 — Lancet, 2 (7), 177-188.  
ALEXANDER, A. e outros — 1928 — Dermatomykosen, Berlin (Vol. XI de Handbuck der Haut: Und geschlechtskrankheiten, publicado sob a direção de J. Jadasson).  
ALMEIDA, F. F. — 1939 — Mycologia Médica, ed. Cia. Melhoramentos de São Paulo.  
BESSEY, E. A. — 1935 — A Text-Book of Mycology, Philadelphia.  
CHAIN, E. e outros — 1940 — Lancet, 2, 226-228.  
CHAIN, E. — 1941 — Lancet, 2 (25), 762.  
CLUTTERBUCK, P. W.; LOWELL, R. e RAISTRICK, H. — 1932 — Biochem. Journal — 26, 1907-1918.  
DODGE, C. W. — 1935 — Medical Mycology, Ed. C. W. Mosby Company.  
FLEMING, A. — 1929 — Brit. Journ. Exp. Path., 10, 222-236.  
FLEMING, A. — 1941 — Lancet, 2 (25), 761.  
REID, R. D. — 1935 — Journal of Bacteriology, 29, 215-221.  
THOM, C. — 1930 — The Penicillia, Baltimore.

